(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Basel)

Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels des Histidins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

Vorgelegt von
HANS RUDOLF STAEHELIN
aus Basel

1941
Buchdruckerei Gaiser & Haldimann Basel

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von *Prof. Dr. S. Edlbacher.*

Tag der Promotion: 8. Mai 1941.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Nachdem die grundlegenden Arbeiten von *Emil Fischer* (1) und von *A. Kossel* (2) weitgehenden Aufschluss über die Konstitution der Eiweisskörper gebracht hatten, konnten die einzelnen Aminosäuren in Bezug auf ihre biologische Wirksamkeit eingehend untersucht werden. Eine der nächstliegenden Fragen war das Problem der Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für den Stoffwechsel. Insbesondere musste untersucht werden, welche der gefundenen Eiweissbausteine für den Organismus entbehrlich und welche unentbehrlich sind. Umfassende Untersuchungen zahlreicher Forscher haben sich daher mit der Frage beschäftigt. Insbesondere haben *Rose* und seine Mitarbeiter (3) diese Probleme weitgehend geklärt. Sie stellten Nahrungssätze her, in denen das Eiweiss durch Aminosäure-Gemische ersetzt war, bei denen abwechselnd die eine oder die andere Aminosäure fehlte. Sie konnten an der Gewichtszunahme beim wachsenden Tier die Unentbehrlichkeit des fehlenden Stoffes erkennen. Daraus ist zu schliessen, dass gewisse Aminosäuren vom wachsenden Säuger entweder gar nicht oder nur in ungenügender Menge gebildet werden können.

Wie weit der Organismus die Fähigkeit zum Aufbau der einzelnen Aminosäuren besitzt, bedarf noch weiterer Forschung. Spezielles Interesse erheischen die Ringsysteme, über deren Bildungsmöglichkeit im Körper (Zyklopoiese von *Osborne*) noch nicht in jedem Falle ein abschliessendes Urteil gefällt werden kann.

Diese Frage hat in bezug auf das Histidin ein besonderes Interesse. Diese Aminosäure wurde 1896 von *A. Kossel* (4) bei der Aufteilung der durch Phosphorwolframsäure fällbaren basischen Spaltprodukte des Histons mittels Silbernitrat entdeckt. Sie ist ein Baustein der meisten pflanzlichen und tierischen Proteine. Die Versuche von *Rose* und *Cox* (5) zeigten wenigstens die Unentbehrlichkeit am wachsenden Organismus. *Burroughs*, *Burroughs* und *Mitchel* (6) untersuchten nun die Unentbehrlichkeit der verschiedenen Aminosäuren an der *ausgewachsenen* Ratte, indem sie die Stickstoff-Bilanz als Index benützten. Sie fütterten verschiedene Aminosäure-Gemische und kamen zum Schluss, dass beim ausgewachsenen Tier das Histidin entbehrlich wäre. Gegen die Untersuchungen dieser amerikanischen Autoren ist einzuwenden, dass

1. die Hauptversuchsperiode von zu kurzer Dauer war, und dass

2. das verfütterte Aminosäure-Gemisch teilweise aus racemischen Aminosäuren bestand. Nun ist es sicher, dass von den racemischen Aminosäuren ein Teil unverändert im Harn erscheint. Dementsprechend müssen Schlüsse, die aus der Stickstoff-Bilanz in so kurzdauernden Versuchen gezogen werden, zu Irrtümern führen. Nach den Untersuchungen von *Rose* und *Cox* (5) verhält es sich so, dass Zusatz von Histidin den Wachstumsstillstand aufhebt. *β-Alanin*histidin (Carnosin) *(du Vigneaud* (7)*)*, β-Imidazolylmilchsäure, in geringerem Masse auch Imidazolbrenztraubensäure *(Harrow* (8)*)* vermögen das Histidin in der Nahrung zu ersetzen. Zusatz von d-Histidin zur Mangelnahrung hat annähernd die gleiche Wirkung wie ein solcher von l-Histidin.

Das wegleitende Problem, das uns bei dieser Arbeit nun beschäftigte, war die Frage nach dem Schicksal des Histidins im Stoffwechsel. *F. Knoop* und *Neubauer* (9) stellten für den Abbau der Aminosäuren die Theorie auf, dass diese Verbindungen auf dem Wege der oxydativen Desaminierung über die Ketonsäuren abgebaut werden. Dieser Weg erschien ursprünglich als der wahrscheinlichste, da einerseits die oxydative Desaminierung ein stark exothermer Vorgang ist, während die hydrolytische Desaminierung zur betreffenden Oxysäure für den Organismus energetisch wertlos ist. Andererseits konnten *F. Knoop* und seine Mitarbeiter zeigen (10), dass die α-Ketonsäuren bei der katalytischen Aminierung sich glatt in die entsprechenden racemischen α-Aminosäuren umwandeln lassen, ein Vorgang, auf den wir weiter unten noch zurückkommen werden. In Verfolgung dieser Gedankengänge untersuchte nun *A. Krebs* (11) den Abbau der Aminosäuren durch überlebende Organschnitte und -Extrakte. Er konnte tatsächlich die Bildung von Ammoniak und Ketonsäure in einzelnen Fällen nachweisen. Bei seinen Untersuchungen wurde auch parallel mit der Bildung des Ammoniaks ein starker Sauerstoff-Verbrauch konstatiert. Das ganze Problem kompliziert sich aber dadurch, dass ein grundsätzlicher Unterschied darin besteht, ob es sich um die der l-Reihe zugehörigen natürlichen Aminosäuren oder um die der d-Reihe zugehörigen unnatürlichen Aminosäuren handelt. *Krebs* konnte zeigen, dass man namentlich aus Niere sowie auch aus Leber ein Enzym extrahieren kann, welches d-Alanin und d-Glutaminsäure in sehr starkem Masse oxydativ abbaut und konnte auch die entsprechenden Ketonsäuren in Form von Dinitrophenylhydrazonen nachweisen. Bei den übrigen d-Aminosäuren schwanken die erhaltenen Werte je nach Tierart und Aminosäure bedeutend. In derartigen Organextrakten ist also ein Enzym vorhanden, welches als d-Aminosäureoxydase bezeichnet wird, und

das von *O. Warburg* (12) auch in der Form eines Alloxazinproteides dargestellt werden konnte. Dieses Enzym ist extrem spezifisch auf die unnatürliche d-Konfiguration der Aminosäuren eingestellt. Die natürlichen l-Aminosäuren werden von diesem Enzym überhaupt nicht angegriffen. Wie *Krebs* (11) auch weiterhin in seiner ersten Mitteilung schon feststellen konnte, findet sich nun aber in den Zellen von Leber und Niere ein weiteres Enzym, welches man zunächst als l-Aminosäureoxydase bezeichnen kann. Dieses Enzym ist nicht extrahierbar, seine Wirksamkeit ist nur im überlebenden Organschnitt zu beobachten und seine Natur zunächst vollkommen unbekannt. Blausäure, Oktylalkohol vernichten seine Wirkung. Diese ist, wie schon erwähnt, an die intakte Struktur gebunden. Untersucht man nun die Wirkung dieser l-Aminosäureoxydase, so findet man, dass sich nur beim Alanin und bei der Glutaminsäure die typische oxydative Desaminierung unter Bildung von Ketonsäuren nachweisen lässt. Nach Untersuchungen von *K. Felix* (13), die namentlich am Tyrosin angestellt wurden, lässt sich die Ketonsäure beim Abbau von l-Aminosäure als Zwischenprodukt nicht nachweisen. Das bisherige einfache Schema nach *F. Knoop* und *Neubauer:*

Aminosäure—→Iminosäure—→Ketonsäure—→Aldehyd—→Fettsäure

gilt also zunächst nur für eine Reihe von unnatürlichen d-Aminosäuren sowie für l-Alanin und l-Glutaminsäure. Der Hauptabbauweg der natürlichen einfachen und komplizierten Aminosäuren der l-Reihe ist *noch unbekannt.*

Eine sehr interessante Erklärung für die Bildung und Zerstörung von Aminosäuren im Organismus liefert die Umaminierungsreaktion von *Braunstein* und *Kritzmann* (14). Darnach kann l-(+)Glutaminsäure ihre Aminogruppe mit Ketosäuren umtauschen und in α-Glutarsäure übergehen. Dieser Vorgang kann auch in umgekehrtem Sinne verlaufen. Die Glutaminsäure entsteht wahrscheinlich unter dem Einfluss der von *H. von Euler* (15) gefundenen l-(+)Glutaminsäuredehydrase aus α-Ketoglutarsäure, die dem Kohlehydratstoffwechsel zu entstammen scheint.

Als Endprodukt des Stickstoff-Stoffwechsels kennen wir im Säugerorganismus den Harnstoff. Nach den Anschauungen von *A. Krebs* (11) geht der Weg von dem durch die oxydative Desaminierung freigewordenen Ammoniak zum Harnstoff über Arginin, und zwar in der Weise, dass Ammoniak in der Leber mit Citrullin Arginin bildet, welches weiterhin durch die Tätigkeit der Arginase in Ornithin und Harnstoff zerfällt. Nach *Fr. Leuthardt* (16) erfolgt die Bildung von Harnstoff aus Ammoniak über das Glutamin, welches als Überträger funktio-

niert und nach Abgabe des Ammoniaks in Glutaminsäure übergeht. Die Purinsynthese im Organismus der Sauropsiden, die ja als Endprodukt nicht Harnstoff, sondern Harnsäure ausscheiden, steht in Analogie zum Fehlen der Arginase in der Sauropsiden-Leber, eine Tatsache, auf die zuerst *A. Clementi* hingewiesen hatte. Nach *Wiener* (17) stellt man sich die Synthese der Harnsäure beim Sauropsiden so vor, dass zwei Moleküle Harnstoff mit einem 3-C-Körper zu dem Diureid Harnsäure zusammentreten. *W. Schuler* (18) konnte fernerhin zeigen, dass eine sogenannte Harnsäurevorstufe, das Hypoxanthin, zunächst in der Leber gebildet wird, welches dann oxydativ in der Niere in Harnsäure überführt wird. Bei allen diesen Vorstellungen wird demnach zuerst die Bildung von Harnstoff angenommen, und diese Vorstellung steht in einem gewissen Widerspruch zum vollkommenen Fehlen der Arginase in der Sauropsiden-Leber. Es kann demnach die Harnsäure-Synthese beim Sauropsiden schwerlich in so einfacher Weise vor sich gehen, dass zunächst Harnstoff gebildet wird, sondern man ist gezwungen, anzunehmen, dass die Bildung des Purinrings in einer noch unbekannten Weise mit Umgehung des Harnstoffs zustande kommt. Dementsprechend kann man sich noch kein richtiges Bild über die Purinsynthese bei den Sauropsiden bilden.

Versucht man sich eine allgemeine Vorstellung über den Abbauweg der einfacheren Aminosäuren zu machen, so kann man mit allem Vorbehalt zu der Vorstellung gelangen, dass als erster Schritt eine Decarboxylierung erfolgt und das entsprechende Amin dann in den Aldehyd übergeführt wird, der dann zur Fettsäure oxydiert wird, die nun ein C-Atom weniger enthält als die ursprüngliche Aminosäure. Doch ist dieser Weg wirklich erwiesen zunächst nur für das Tyrosin, wie *K. Felix* und *Zorn* (13) zeigen konnten. Die komplizierter gebauten Aminosäuren wie Tryptophan, Cystin, Arginin und Histidin erleiden aber im Stoffwechsel wahrscheinlich ein ganz individuelles Schicksal. So konnten *A. Kossel* und *Dakin* (19) durch die Entdeckung der oben erwähnten Arginase zeigen, dass der Hauptumsatz des Arginins mit der Harnstoffsynthese in Beziehung zu setzen ist. Dass tatsächlich eine Decarboxylierung des Arginins im tierischen Organismus möglich ist, wird durch die Auffindung des Agmatins in den Herings-Testikel durch *A. Kossel* (20) wahrscheinlich gemacht. Durch zahlreiche Arbeiten wurde weiterhin in Bezug auf das Arginin der Übergang dieser Aminosäure in Kreatin untersucht und ebenfalls mit grosser Wahrscheinlichkeit nachgewiesen. Es ist wahrscheinlich, dass das Kreatin aus der Guanidinessigsäure, die durch den oxydativen Abbau der Seitenkette des Arginins entsteht, gebildet wird. Dass das Arginin auch

andere Funktionen im tierischen Organismus zu erfüllen hat und nicht nur mit der Harnstoff-Synthese und der Kreatinbildung in Beziehung zu setzen ist, geht aus zahlreichen Untersuchungen über das Vorkommen der Arginin-spaltenden Fermente unseres Institutes hervor.

Bezüglich der zweiten Hexonbase, des Histidins, liegen nun die Verhältnisse ähnlich wie beim Arginin. Auch hier findet sich in der Leber ein hydrolytisch wirkendes Enzym, die von *S. Edlbacher* (21) gefundene Histidase, die das Histidin am Imidazolring angreift und unter Ammoniak-Bildung spaltet. Dabei entstehen verschiedene sehr leicht zersetzliche Zwischenprodukte, die bei der Aufarbeitung der Spaltungsansätze zum Schluss natürliche l-(+)Glutaminsäure liefern. Es ist wahrscheinlich, dass auch in vivo die Umwandlung der primären Zersetzungsprodukte in Glutaminsäure stattfindet. Die zentrale Stellung, die die Glutaminsäure in vielen Stoffwechselreaktionen einnimmt, und die besonders H. von *Euler* (15) untersucht hat, wird durch diese Tatsache hervorgehoben. Neben diesem hydrolytischen Abbauweg durch die Leberhistidase, die auch in der Sauropsidenleber mit gleicher Intensität wirkt, sind nun noch andere Abbauwege des Histidins bekannt. Diese Abbaureaktionen, wie die Decarboxylierung zu Histamin, wie sie durch *Bloch* und *Pinösch* (22), sowie von *Holtz* (23) und von *Werle* (24) für den Organismus sichergestellt wurden, und die Bildung von Urocaninsäure betreffen normalerweise nur ganz geringe Mengen des Histidins. Die Histaminbildung im tierischen Organismus ist eine so geringe, dass sie nicht genügen würde, um über das Schicksal des gesamten Histidins Aufschluss zu geben. Urocaninsäure kann nur gefunden werden, wenn abundante Mengen von Histidin verabreicht werden *(Kotake* und *Konishi* (25)*)*. Wahrscheinlich kann die Leber in diesem Fall den normalen Histidinabbau nicht bewältigen, und es wird der Nebenweg der Bildung von Urocaninsäure (Imidazolacrylsäure) eingeschlagen. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass Urocaninsäure ein normales Zwischenprodukt des Histidinabbaus ist, indem Durchströmungsversuche an der überlebenden Leber eine Vermehrung der Acetessigsäurebildung erkennen liessen *(Konishi)* (25)*)*. Dabei geht der Weg nicht über Imidazolmilchsäure, da Verfütterung dieser Substanz keine Urocaninsäurebildung veranlasst. (Vergleiche jedoch weiter unten, Seite 10.)

Durch die Tätigkeit von Bakterien kann Histidin in sehr verschiedene Abbauprodukte übergehen, z. B. Histamin, Imidazolpropionsäure, Imidazolessigsäure u. a. Diese Möglichkeiten sind durch Untersuchungen von *Raistrik* (26) in ausführlicher Weise studiert worden. Auf bakterielle Zersetzung ist wahrscheinlich

auch das Verschwinden von Histidin durch das von *Borghi* (27) entdeckte Hautferment zurückzuführen *(Edlbacher* und *Litvan* (28)*)*.

Endlich sei noch ein von *Edlbacher* und *von Segesser* (29) angegebener oxydativer Abbauweg des Histidins erwähnt, der in Gegenwart von Sauerstoff durch Ascorbinsäure stattfindet und durch Eisen aktiviert wird. Ganz ähnlich wie bei der Histidasespaltung wird der Imidazolring geöffnet und ein Molekül Ammoniak freigemacht. Dabei tritt starke Pigmentbildung ein. Diese Reaktion unterscheidet sich aber von der Histidasereaktion dadurch, dass sie nur bei Gegenwart von Sauerstoff verläuft.

Das Histamin wird in der Leber, Niere und Darmschleimhaut durch die Tätigkeit der von *Best* (30) entdeckten und von *Zeller* (31) als Diaminoxydase identifizierten Histaminase oxydativ desaminiert.

Eine Beziehung des Histidins zum Purinstoffwechsel ergibt sich daraus, dass bei wachsenden Ratten bei Histidin-freier Nahrung die Allantoinausscheidung sinken soll.

Auf Grund der verschiedenen Abbaumöglichkeiten des Histidins erhebt sich die Frage nach ihrer physiologischen Bedeutung. So ist es denkbar, dass zwischen Histidase, welche den Imidazolring zerstört, und der Histidindecarboxylase ein Wechselverhältnis besteht, in dem Sinne, dass gegenüber der Gefahr einer zu starken Histaminanreicherung die Histidase eine vermehrte Aktivität entfalten würde. Umgekehrt könnte die von *Holtz* (23) und von *Werle* (24) entdeckte Histidindecarboxylase einem zu starken Abbau des für den Körper unentbehrlichen Imidazolrings entgegenwirken.

Einen weiteren Aspekt eröffnete die Feststellung, dass in der *menschlichen* Gravidität Histidin im Harn ausgeschieden wird. *Kapeller-Adler* (32) hat mittels der von ihr ausgebauten *Knoop*'schen Bromierungsreaktion weitgehende Untersuchungen angestellt. In unserem Institut und in der medizinischen Universitätsklinik Basel wurden dreihundert Personen auf Histidinurie untersucht *(Tschopp* und *Tschopp*(33)*)*. Es wurde gefunden, dass zwar ein grosser Prozentsatz von Graviden Histidin ausscheidet, dass aber kein spezifischer Schwangerschaftsnachweis damit angestellt werden kann, da auch Nichtgravide und Männer manchmal Histidin ausscheiden. Sehr interessant ist die Feststellung, dass Tiere (untersucht wurden Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen, Hund, Katze, Macacus rhesus) in der Schwangerschaft keine Histidinurie aufweisen *(Kapeller-Adler* (36)*)*. Nun ist aber bekannt, dass der Mensch der Säuger ist, der Prolan in der Gravidität ausscheidet. *Kapeller-Adler* konnte feststellen, dass die Leber von graviden Frauen nicht imstande ist, Histidin abzubauen. Zusatz von Prolan zu Menschenleber hemmt

die Spaltung von Histidin. *Kapeller-Adler* zieht aus diesen Tatsachen den Schluss, dass Prolan die Histidase der Leber hemmt, was auch *H. Baur* in unserem Institut in noch unveröffentlichten Versuchen feststellen konnte, und dass durch die abundante Prolanproduktion während der menschlichen Gravidität ein Abbau des Histidins verhindert wird. Ich komme auf diese Frage weiter unten noch näher zu sprechen.

Die Entdeckung, dass die optischen Isomeren der Aminosäuren vom tierischen Organismus verschieden verwertet werden, hat ganz neue Gesichtspunkte ergeben, auf die wir oben schon hinwiesen. Die Isolierung der optischen Isomeren des Histidins, wie sie zuerst durch *Pymann* (35) und *Abderhalden* (36) durchgeführt worden ist, ermöglichte das Studium ihrer biologischen Wirksamkeit. Sämtliche Aminosäuren, welche normalerweise in den Eiweisskörpern vorkommen, gehören der gleichen Konstitution, nämlich der links-Reihe an. Für das Histidin konnten *Cox* und *Berg* (37) zeigen, dass sich nach Zusatz von d-Histidin das Wachstum der jungen Ratte annähernd gleich verhielt, wie wenn links-Histidin zu der sonst histidinfreien Nahrung zugesetzt wurde. *Conrad* und *Berg* (38) haben auf Grund von Organanalysen aus den auf obige Weise ernährten Ratten festgestellt, dass die d-Form in l-Histidin umgebaut wird. Dass ein Abbau der unnatürlichen Form im Organismus nicht oder nur in sehr geringem Masse stattfindet, haben die Arbeiten von *E. Abderhalden* und *Hanson* (39) sowie von *Edlbacher* und *Baur* (40) bewiesen: Während subcutan injiziertes l-Histidin nur zu einem kleinen Teil im Harn wieder nachgewiesen werden kann, findet man die d-Form fast quantitativ wieder. Es beruht dieses Verhalten auf der Spezifität der Histidase, welche die d-Form vollkommen intakt lässt. Die Erklärung dieses Verhaltens könnte darin liegen, dass sich die Histidase ähnlich verhält wie die Arginase. Bei diesem Enzym konnten *Edlbacher* und *Zeller* (41) eine Spaltung auch der d-Form erreichen, wenn sie einen grossen Überschuss des Fermentes zusetzten. Die Frage ist jedoch bisher noch unentschieden, da die Isolierung der Histidase auf grosse Schwierigkeiten stösst und somit keine Konzentrate hergestellt werden konnten.

Im Einklang mit dem Intaktbleiben des d-Histidins steht der Befund von *Konishi* (25), dass Urocaninsäure nur nach Verfütterung von l-Histidin im Harn nachzuweisen ist. *Kiyokawa* (42) verabreichte an Kaninchen l-Histidin, fällte den Harn mit Phosphorwolframsäure und konnte merkliche Mengen von Urocaninsäure isolieren. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den oben zitierten Angaben von *Abderhalden* und *Hanson* (39), welche bei Verabreichung von grösseren Mengen von l-Histidin keine oder nur geringe

Mengen dieser Aminosäure im Harn wiederfanden, die aber keine Urocaninsäure im Harn nachweisen konnten. Um diese Diskrepanz zu klären, wiederholten wir die Versuche von *Kiyokawa* einerseits und von *Abderhalden* und *Hanson* andererseits. Kaninchen erhielten beträchtliche Mengen l-Histidin subcutan injiziert, der Harn wurde einerseits mit Phosphorwolframsäure gefällt, andererseits mit der Quecksilberchlorid-Fällung nach *Abderhalden* untersucht. Mittels der Phosphorwolframsäure -Methode ist es uns nicht gelungen, irgendein definiertes Produkt aus dem Harn zu isolieren, hingegen konnte durch die Sublimatfällung l-Histidin gewonnen werden. Von ca. 26 g injiziertem Histidinchlorhydrat, welche drei Tiere erhielten, konnten ca. 4 g in chemisch reiner Form wieder isoliert werden. (Über die Details der Ausführung siehe im experimentellen Teil.) Darnach konnten die Ergebnisse von *Abderhalden* und *Hanson* bestätigt werden, während die Resultate von *Kiyokawa* nicht reproduziert werden konnten. Es erschien auch unwahrscheinlich, dass man mit der ganz unspezifischen Phosphorwolframsäurefällung im Harn zu reiner Urocaninsäure kommen kann. Immerhin ist es denkbar, dass in Japan andere Kaninchenrassen zur Verwendung gelangten. Es sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, dass die Bildung der Kynurensäure auch nur bei ganz spezifischen Rassen beobachtet werden kann.

Die Verhältnisse bei der Ausscheidung von injiziertem Histidin im Harn müssen aber wesentlich komplizierter liegen. Wie schon *H. Baur* (40) bei seinen Belastungsversuchen am Meerschweinchen feststellen konnte, ergibt die ausgeschiedene Histidinmenge im Harn ganz verschiedene Werte, je nach der Methode, die zur Bestimmung dieser Aminosäure im Harn angewendet wird. Wird der Harn mit der nachher beschriebenen Weise stufenphotometrisch untersucht, so erhält man viel höhere Histidinwerte, als wenn man das im Harn ausgeschiedene Histidin durch Zusatz von Leber-Histidase spaltet und die freigewordene Menge von Ammoniak bestimmt. So fand schon *H. Baur* (40), dass bei männlichen Meerschweinchen die photometrisch ermittelten Histidinmengen je nach der verabreichten Dosis 3—4 mal grösser sind, als die enzymatisch im Harn bestimmbaren Mengen von l-Histidin. Es wurde daher durch genaue Versuche ermittelt, dass bei Zusatz von l-Histidin zu Meerschweinchenharn sich enzymatisch mindestens 90% des zugesetzten Histidins durch Histidase bestimmen lassen, sodass also nur eine Differenz von ca. 10% zwischen der photometrischen und enzymatischen Bestimmungsmethode bestehen bleibt. Man muss deshalb annehmen, dass bei der Tierpassage die folgenden Möglichkeiten bestehen:

1. Es ist denkbar, dass ein Teil des ausgeschiedenen l-Histidins sich in einer Form im Harn vorfindet, die sich der direkten enzymatischen Bestimmung entzieht. Als Grund müsste man eine Acetylierung oder eine Bindung an irgendeinen anderen Stoff annehmen; so wäre auch die teilweise Überführung von Histidin in Carnosin oder eine andere ähnliche Verbindung möglich.
2. Die photometrisch bestimmbare Menge ist nicht auf Histidin zu beziehen, sondern auf verschiedene Zersetzungsprodukte dieser Aminosäure, die noch einen intakten Imidazolring besitzen, denn diese Gruppe ist die Ursache der Diazoreaktion. Es wäre in diesem Zusammenhang besonders an die Bildung der oben erwähnten Urocaninsäure zu denken.
3. Die Diskrepanz zwischen enzymatischer und photometrischer Bestimmung kann nicht im Gehalt des Harns an anderen chromogenen Substanzen liegen, wie im experimentellen Teil noch gezeigt werden wird.

Aus der Tatsache, dass es bisher nicht gelungen ist, aus dem Histidin-Kaninchenharn Urocaninsäure zu isolieren, und aus der oben erwähnten Diskrepanz zwischen photometrischem und enzymatisch ermitteltem Histidingehalt des Harns ergibt sich, dass hier der Schlüssel zu einem wesentlichen Stoffwechselproblem dieser Aminosäure zu suchen ist. Es sind deshalb gegenwärtig auch Untersuchungen im Gange, die Differenz zwischen photometrischem und enzymatischem Wert im Histidin-Meerschweinchenharn zu klären*).

Interessante Verhältnisse herrschen in Bezug auf das Links-Rechtsproblem bei der Decarboxylierung von Histidin. *Bloch* und *Pinösch* (22) konnten zeigen, dass parenterale Zufuhr von l-Histidin beim Meerschweinchen eine Anreicherung von Histamin in der Lunge bewirkt. Die Wiederholung mit d-Histidin ergab, dass nach kurzer Belastung keine Histaminanreicherung zu konstatieren war, nach längerer Belastung jedoch eine deutliche Zunahme des Histamins auftrat. *(Edlbacher, Simon, Becker* (43)*)*.

Wie oben schon gesagt wurde, hat *Krebs* (11) den verschiedenartigen Abbau der d- und l-Form untersucht. Er fand, dass die

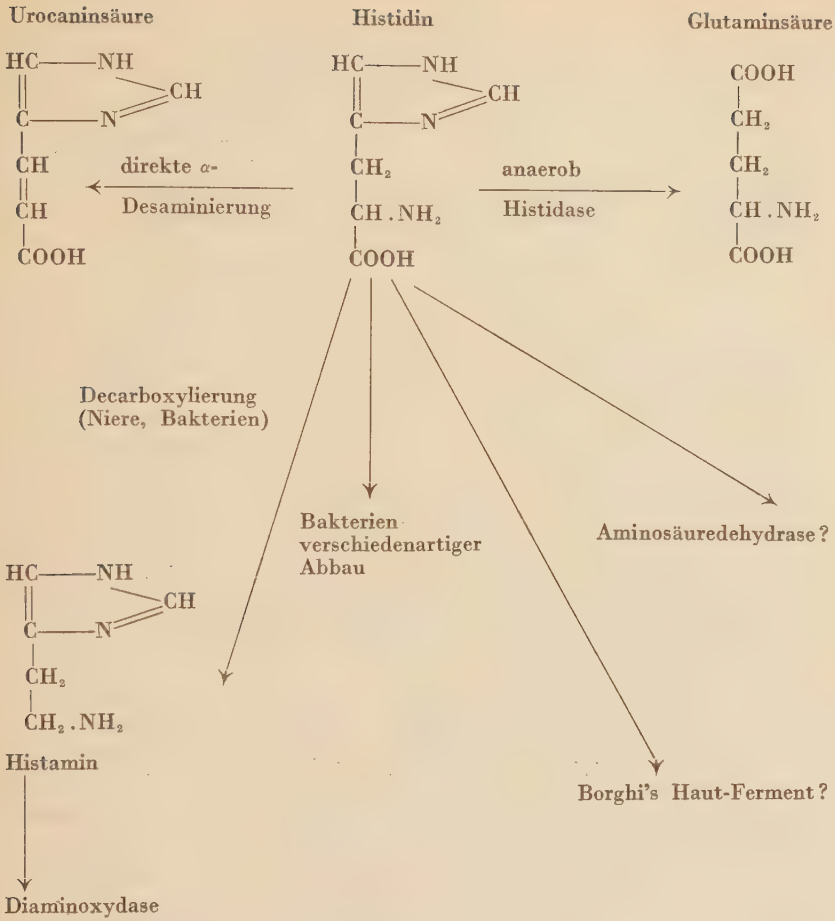
*) Eine nachträgliche Überprüfung der ganzen Verhältnisse hat ergeben, dass bei Ausschaltung gewisser experimenteller Schwierigkeiten die im Harn nach Injektion aufgefundene Histidinmenge sowohl mit der photometrischen als enzymatischen Methode übereinstimmt, und zwar dann, wenn man zu den enzymatisch bestimmten Histidinwerten 10% zuzählt. Dadurch sind die oben im Text erwähnten drei Fragen auf eine reduziert. (Siehe Z. f. physiol. Chem. **270**, 165 (1941).

oxydative Desaminierung der optischen Isomeren durch zwei verschiedene Fermente erfolgt; die links-Aminosäuredesaminase liess sich dadurch von der d-Aminosäuredesaminase unterscheiden, dass sie durch Oktylalkohol, Blausäure sowie durch Zerstörung der Zellstruktur und durch Trocknen unwirksam wird. Die Frage nach der Natur der Abbau-Fermente der natürlichen Aminosäuren ist also, wie oben erwähnt, noch nicht geklärt.

Ebenso wenig wissen wir, wie im tierischen Organismus die Umwandlung der unnatürlichen Form in die natürliche vor sich geht. Es kann sich um verschiedene Fermente handeln, die beide schon vorgebildet sein können oder sich erst unter dem Einfluss der zugeführten Substanz entwickeln können. Es wäre auch denkbar, dass es sich um ein und dasselbe Ferment handelt, bei welchem sich das spezifische Trägerprotein das eine Mal auf das arteigene, das andere Mal auf das artfremde Eiweiss umstellt *(E. Abderhalden* (44)*)*.

Den Übergang der d- in die l-Form könnte man sich chemisch als *Walden*'sche Umkehrung denken, wie man sie in vitro durchführen kann.

Diese Frage bekommt ganz besonderes Interesse durch die Behauptung *Kögl*'s (45), dass in malignen Tumoren racemisierte Aminosäuren vorkommen, und dass speziell die d-Form der Glutaminsäure und des Arginins einen beträchtlichen Anteil im Tumorprotein ausmachen sollen. Es wäre denkbar, dass es sich dabei um eine Anreicherung von normalerweise abgebauten Formen, eben der unnatürlichen, infolge „Fermententgleisungen" handelt. Im folgenden Schema sind die bisher bekannten Abbau-Möglichkeiten des Histidins zusammengefasst:



Problemstellung

1. Im Hinblick auf die oben erwähnten Belastungsversuche soll festgestellt werden, wieviel von subcutan injiziertem Histidin wieder ausgeschieden wird. *Abderhalden* und *Hanson* (39) konnten bei ihren Versuchen am Kaninchen nach Verabreichung von 4 g l-Histidinhydrochlorid nichts mehr aus dem Harn isolieren, bei

der Verabreichung von d-Histidinhydrochlorid bis 2,5 g zwischen 45 und 65%. *Edlbacher* und *Baur* (40) fanden mittels der unten beschriebenen Diazoreaktion bei einer Einspritzung von 0,6 g l-Histidinhydrochlorid pro 100 g Körpergewicht 30%, bei 0,2 g 22%, bei 1,15 g 12% und bei 0,1 g nichts mehr im Harn. Die mit der Histidasereaktion erhaltenen Werte betrugen jeweils ⅓ bis ¼ des photometrischen Resultates. Bei Verabreichung von d-Histidin liess sich photometrisch 70—95% im Harn nachweisen.

Es werden zunächst diese Verhältnisse für das l-Histidin bei nichtgraviden weiblichen Meerschweinchen nachgeprüft.

2. Wenn die Annahme von *Kapeller-Adler* richtig ist, dass Prolanausschüttung die Ursache der menschlichen Histidinurie ist, so müsste eine Belastung des graviden Organismus mit Histidin eine Herabsetzung der Ausscheidungsschwelle bewirken. *Kapeller-Adler* hat diese Frage zu lösen versucht, indem sie graviden Frauen l-Histidin oral verabreichte. Dabei wurde die Dosis unverändert wieder ausgeschieden, während bei Männern sich nichts im Harn nachweisen liess. Ein innert drei Tagen mit insgesamt 900 mg l-Histidin subcutan belastetes gravides Meerschweinchen schied kein Histidin aus. Auch der Gesamtstickstoff war nicht erhöht.

Hier soll bestimmt werden, ob die Ausscheidungsgrenze beim graviden Meerschweinchen gegenüber der Norm herabgesetzt ist.

3. *Kotake* und *Konishi* (25), *Konishi* und *Tani* (46) haben Hunden Imidazolmilchsäure verfüttert und im Gegensatz zu Histidinverabreichung keine Urocaninsäure erhalten. Es soll nun mittels unserer Diazoreaktion das Ergebnis nachgeprüft werden. Damit soll bewiesen werden, dass die α-Aminogruppe für die Wirksamkeit der Histidase ein integrierender Bestandteil ist.

4. Um die im theoretischen Teil schon erwähnte Diskrepanz zwischen photometrischer und enzymatischer Bestimmung des Histidins im Harn sicherzustellen, werden Versuche in dem Sinn durchgeführt, dass zu frischem Meerschweinchenharn Histidin in wechselnder Menge zugesetzt wird. Dieses Histidin wird nun mit beiden Methoden bestimmt. Es ergibt sich, dass mit der photometrischen Methode der theoretisch zu erwartende Wert an Histidin gefunden wird, und dass mit der enzymatischen Methode 90% des zugesetzten Histidins ermittelt werden können.

Methodik

Histidin gibt in alkalischer Lösung mit Diazobenzolsulfosäure einen roten Azofarbstoff. *Kössler* und *Hanke* (47) haben diese von *Pauly* gefundene Farbreaktion zu einem kolorimetrischen Verfahren ausgearbeitet. Bei der Kuppelung von Histidin mit der diazotierten Sulfanilsäure entsteht aber kein einheitlicher Farbstoff, sondern es bilden sich gelbe, bräunliche und rote Farbtöne nebeneinander. Wahrscheinlich entstehen Mono-, Di- und auch Triazoverbindungen. Auch beim peinlichen Einhalten gleicher Reaktionsbedingungen hängt die Farbe des gebildeten Azofarbstoffes von unberechenbaren Nebenumständen ab. Trotz zahlreichen Verbesserungsvorschlägen erlaubt daher das von *Kössler* und *Hanke* angewandte Verfahren nur approximative Bestimmungen.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von Histidin bietet die *Knoop*'sche Reaktion. Histidin gibt beim Behandeln mit Bromwasser in der Wärme einen braunen Farbstoff, der allmählich ausflockt. Führt man die Bromierung mit Brom-Eisessig aus und alkalisiert man hierauf mit Ammoniak und Ammoncarbonat, so entstehen violette Farbtöne. Diese Variation bot die Grundlage für das kolorimetrische Verfahren, welches *Kapeller-Adler* ausgearbeitet hat und welches durch sie und andere mehrfach verbessert wurde. Obgleich diese Methode einen wesentlichen Fortschritt bedeutet, kann auch sie, wie zahlreiche Untersuchungen dieses Instituts (*Tschopp* und *Tschopp* (33)) gezeigt haben, nur zu angenäherten Schätzungen verwandt werden. Die hauptsächliche Schwierigkeit liegt in der Bromierung.

Im Bestreben, über eine genaue Histidinbestimmung zu verfügen, haben nun *Edlbacher*, *Baur*, *Staehelin* und *Zeller* eine Methode ausgearbeitet, die demnächst veröffentlicht wird. Die Konstanz des Farbstoffes konnte dadurch erreicht werden, dass zur Diazotierung nicht Sulfanilsäure, sondern ein Chloranilin verwendet wurde. Durch Einführung von 1 oder 2 Chloratomen in das Anilin erhält man einen Azofarbstoff, der sich aus der wässrigen Lösung mit organischen Lösungsmitteln ausschütteln lässt. Er wird dadurch sehr beständig und bietet die Möglichkeit einer genauen kolorimetrischen Bestimmung. Es sind noch $0{,}4 \cdot 10^{-7}$ Mol Histidin pro ccm bestimmbar, was 6γ Histidin pro ccm entspricht. Verwandt wurde das 1,2,4-Dichloranilin und das p-Chloranilin. Ersteres ist leicht zersetzlich und gibt einen etwas grösseren Leerwert, sodass gegenwärtig nur noch das p-Monochloranilin verwendet wird. Es wurde auch das α-Naphthylamin auf seine Verwendbarkeit als Diazo-

reagenz geprüft. Es erwies sich als ungeeignet, da bereits beim Diazotieren ein gefärbter Niederschlag ausfällt.

Trotzdem diese Methode nicht so spezifisch ist, wie die auf der *Knoop*'schen Reaktion basierende *Kapeller-Adler*-Methode, bietet sie den enormen Vorteil, dass die erhaltenen Farbtöne konstant sind, was weiter unten anhand der Adsorptionskurve gezeigt wird.

Beschreibung der Methode

Zur Bestimmung des Histidins wird eine Eichkurve aufgenommen, die am Stufenphotometer eine Ablesung für Mengen von 0,01—0,1 mg der Substanz gestattet. Es werden Mengen von 0,2—1,0 mol/1000 l-Histidinchlorhydrat gegen einen Leerwert abgelesen und die zugehörigen Extinktionen auf der Ordinate eines Koordinatensystems aufgetragen, auf dessen Abszisse die Konzentration angegeben ist. Durch Verbindung der entsprechenden Punkte entsteht als Kurve eine Gerade, welche den Anforderungen des *Beer*'schen Gesetzes genügt (Konzentration umgekehrt proportional dem Quadrat der durchgelassenen Lichtmenge). Als Filter wird S 45 verwandt, da bei dieser Farbe die Extinktion maximal ist und die durch andere Farbstoffe erzeugten Färbungen am wenigsten stören.

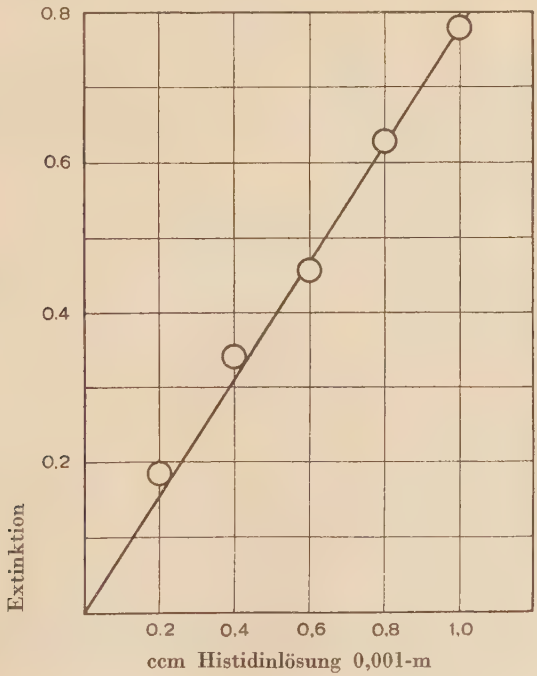
Zur Bestimmung des Histidins im Harn erwies sich eine Verdünnung von 1:100 am günstigsten. Von dieser Lösung wird 1 ccm zur Bestimmung verwandt. Als Diazoreagenz dient eine frisch bereitete Mischung von 2 Teilen 0,25 % p-Monochloranilin in salzsaurer Lösung (0,5 g p-Monochloranilin + 5 ccm konzentrierte Salzsäure ad 200 ccm Wasser) und ein Teil Natriumnitrit, 0,5 % in wässriger Lösung. Der Harn wird mit 5 ccm 0,55% (mol/20) Natriumcarbonat versetzt, dazu gibt man 0,5 ccm Diazoreagenz und schüttelt nach 3 Minuten mit 10 ccm n-Butylalkohol aus, filtriert und liest hierauf in der Küvette von 5 mm Durchmesser im Stufenphotometer ab. Sämtliche Reagentien werden im Eisschrank bei 0^0 aufbewahrt und eisgekühlt für die Reaktion verwendet.

Beispiel einer Eichkurve

Standard ccm m/1000 Histidin-chlorhydrat	$\frac{J^*)}{J^0}$	Ext.**)
Leerwert	98,8	—
0,2	65,0	0,187
0,4	45,7	0,340
0,6	35,0	0,456
0,8	23,0	0,631
1,0	16,4	0,785

*) $\frac{J}{J^0} = \frac{\text{durchgelassenes Licht}}{\text{einfallendem Licht}} = \%$ Durchlässigkeit

**) Ext. = Extinktion = $-\log \frac{J}{J^0}$



Beschreibung der Versuche

Die Meerschweinchen werden bei einer Nahrung von Hafer, Rüben, Wasser im Stoffwechselkäfig gehalten. Der 24-Stundenharn wird, nach Zusatz von genügend Toluol (Kontrolle am Ammoniakwert im Leeransatz), in geeigneten Gefässen aufgefangen. Es wurde jeweils ein Vorversuchstag und drei Versuchstage durchgeführt. Die Belastung der Tiere erfolgt durch subkutane Injektion einer mit Natronlauge neutralisierten Lösung (bei Histidin 10%, bei Imidazolmilchsäure 5%). Die angegebenen Mengen beziehen sich auf je 100 g Körpergewicht.

1. Versuchsreihe

Belastung nichtgravider weiblicher Meerschweinchen mit l-Histidinchlorhydrat

Die von *Edlbacher* und *Baur* (4) bei männlichen Meerschweinchen gefundenen Werte für die l-Histidinausscheidung wurden am nichtgraviden weiblichen Meerschweinchen nachgeprüft.

Es werden bestimmt:

Gesamtimidazol	(photometrisch),
Gesamtstickstoff	(Kjeldahl),
Histidin	(Histidase),
Harnstoff	(Urease).

Die einzelnen Ansätze sind folgende:

1. *Gesamtimidazol:* siehe unter Beschreibung der Methode (S. 16).
2. *Gesamtstickstoff:* 3 ccm Harn nach *Kjeldahl.*
3. *Urease und Harn-Ammoniak:*
   a) 1 ccm Harn + 3 ccm Ureasepuffer + 3 ccm Urease + 13 ccm Phosphatpuffer ph 8,0;
   b) 1 ccm Harn + 3 ccm Ureasepuffer + 16 ccm Phosphatpuffer ph 8,0.

Die Ansätze werden zur Bestimmung des Ammoniak nach Folin unter Zusatz von 0,5 ccm Toluol 2 Stunden im Thermostat

bei 38° der enzymatischen Spaltung unterworfen, nach dem Alkalisieren mit 2 ccm 30% NaOH 2½ Stunden in 0,02 n-Schwefelsäure destilliert und mit 0,02 n-NaOH zurücktitriert. Die erhaltenen b-Werte sind in der Tabelle von den a-Werten abgezogen. Die Urease wird gewonnen aus einem mittels Permutit gereinigten alkoholisch-wässrigen Auszug aus Sojabohnenmehl.

4. *Histidase und Harn-Ammoniak:*

a) 5 ccm Harn + 10 ccm Phosphatpuffer ph 8,0 + 5 ccm Histidase (entsprechend 1 g Leber);

b) 5 ccm Harn + 15 ccm Phosphatpuffer ph 8,0.

Zusatz von 1 ccm Toluol und enzymatische Spaltung im Thermostaten bei 38° 22 Stunden, anschliessend Bestimmung des Ammoniak nach *Folin* wie unter 3 angegeben.

Die Histidase wird durch Verreiben von Rattenleber mit Quarzsand im Mörser und Verdünnen mit dem vierfachen Gewicht Phosphatpuffer ph 8,0 gewonnen. Die Suspension wird zentrifugiert und frisch verwendet.

Gewicht des Tieres	Injiz. l-Histidin pro 100 g	entspr. reinem Histid.-Total	Tag des Versuchs	Gesamt-N	Harnstoff-N	Histidin enzymatisch N	Ausgeschiedenes reines Histidin			
							Histidase		Photometr.	
g	g	mg		mg	mg	mg	mg	%	mg	%
			Vorv.	161	24,4	0	0	0	0	0
			1.	310	130,0	7,8	43,5	5,5	100	12,7
537	0,2	790	2.	252	18,5	—	—	—	0	0
			3.	216	3,6	—	—	—	0	0
			Zus.				43,5	5,5	100	12,7
			Vorv.	268	166,0	0	0	0	0	0
			1.	472	183	16,6	93,5	10,7	119*	10,4
585	0,2	870	2.	293	13,6	—	—	—	0	0
			3.	321	179	—	—	—	0	0
			Zus.				93,5	10,7	119*	10,4
			Vorv.	164	11,2	5,1	0	0	0	0
			1.	275	50,8	14,3	79,5	10,7	119	16,1
445	0,2	740	2.	190	6,6	—	—	—	0	0
			3.	204	106,0	—	—	—	0	0
			Zus.				79,5	10,7	119	16,1

* an der Grenze der photometr. Bestimmbarkeit.

Sektionsprotokoll

Gewicht des Tieres	Länge der Uterus-Hörner	Form des Uterus	Inhalt des Uterus
537 g	3,5 . 3,7 cm	schlank	o. B.
585 g	7,0 . 2,5 cm	schlank	o. B.
445 g	5,0 . 5,5 cm	schlank	o. B.

2. Versuchsreihe

Belastung gravider Meerschweinchen mit l-Histidinchlorhydrat

Die Ansätze sind gleich wie bei der 1. Versuchsreihe. Zwei der untersuchten Tiere, beide in vorgerücktem Stadium der Gravidität, erhalten zunächst eine Injektion von 0,1 g l-Histidinchlorhydrat pro 100 g Körpergewicht. Es wurde kein Histidin ausgeschieden, was den von *H. Baur* gefundenen Werten bei männlichen Meerschweinchen entspricht. Diese Versuche sind in Serie A wiedergegeben. Serie B, in welcher 0,2 g l-Histidinchlorhydrat pro 100 g Körpergewicht gespritzt wurden, ergibt eine Ausscheidung von 8—18% Gesamtimidazol.

Serie A

Gewicht des Tieres	Injiz. l-Histidin pro 100 g	entspr. reinem Histid.-Total	Tag des Versuchs	Gesamt-N	Harnstoff-N	Histidin enzymatisch N	Ausgeschiedenes reines Histidin			
							Histidase		Photometr.	
g	g	mg		mg	mg	mg	mg	%	mg	%
1015	0,1	740	Vorv.	430	84	6,1	0	0	0	0
			Vorv.	432	—	0,0	0	0	0	0
			1.	367	54,7	1,88	0	0	0	0
			2.	305	98	—	0	0	0	0
			Zus.				0	0	0	0
770	0,1	520	Vorv.	254	84	5,4	0	0	0	0
			Vorv.	282	79	—	0	0	0	0
			1.	314	54	4,3	0	0	0	0
			2.	277	36,6	7,3	0	0	0	0
			Zus.				0	0	0	0

Serie B

Gewicht des Tieres	Injiz. l-Histidin pro 100 g	entspr. reinem Histid.-Total	Tag des Versuchs-	Gesamt-N	Harnstoff N	Histidin enzymatisch N	Ausgeschiedenes reines Histidin			
							Histidase		Photometr.	
g	g	mg		mg	mg	mg	mg	%	mg	%
970[1]	0,2	1460	Vorv.	265	126	1,8	0	0	0	0
			1.	405	135	10,1	56	4,2	189	13
			2.	371	211	—	—	—	0	0
			3.	277	163	0	0	0	0	0
			Zus.				56	4,2	189	13
765[2]	0,2	1150	Vorv.	153	118	1,6	0	0	0	0
			1.	320	67	0?	0?	0	94	8,2
			2.	276	167	0,5	0	0	0	0
			3.	162	92,9	0,61	0?	0	0	0
			Zus.				0	0	94	8,2
515[3]	0,2	910	Vorv.	262	41,5	1,6	0	0	0	0
			1.	372	207,	7,9	94,2	4,8	117	13
			2.	330	16,8	2,2	0	0	0	0
			3.	191	114,0	—	—	—	0	0
			Zus.				94,2	4,8	117	13
523[4]	0,2	770	Vorv.	148	196	—	—	—	0	0
			1.	433	208	14,6	81,5	10,5	134	17,4
			2.	140	28,7	1,1	0	0	0	0
			3.	146	71,6	1,8	0	0	0	0
			Zus.				81,5	10,5	134	17,4

[1] 14 Tage nach dem Versuch an der Geburt von 2 lebenden Jungen gestorben.
[2] Warf an dem Tage nach der Belastung 1 lebendes und ein totes Junges.
[3] Warf am Tage nach der Belastung 2 tote reife Junge.
[4] Sektion am Ende des Versuches zeigte einen Embryo von ca. 3—4 Wochen.

3. Versuchsreihe

Belastung von männlichen Meerschweinchen mit Imidazolmilchsäure

Die Imidazolmilchsäure wurde nach *S. Fränkel* (49) durch Einwirkung von Silbernitrit auf Histidin dargestellt. Die Tiere bekamen eine Injektion von 0,1 g Imidazolmilchsäure pro 100 g

Körpergewicht. Bestimmt wurden die Gesamtimidazolausscheidung mittels der oben beschriebenen Methode, jedoch mit eigener Eichkurve, und der Histidase-Stickstoff mittels Leberhistidase. Die letztgenannte Reaktion ergab, wie zu erwarten war, keine Spaltung des Substrats, weshalb auf die Wiedergabe verzichtet wird.

Tier	Imidazolmilchsäure pro 100 g Gewicht	Total Imidazolmilchsäure	Ausgeschiedene Imidazolmilchsäure (photometrisch)	
	g	mg	mg	%
37	0,1	460	385	84
38	0,1	420	335	80
39	0,1	390	341	83
41	0,1	320	294	92

Die Ausscheidung erfolgte bei allen Tieren am 1. Tag.

Weiterhin erhielten drei Kaninchen im ganzen 26 g l-Histidinchlorhydrat in neutraler Lösung subcutan in einmaliger Dosis injiziert. Der Harn von 2 Tagen wird vereinigt und nun bei ganz schwach saurer Reaktion mit einer alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid gefällt. Der Quecksilberniederschlag wird abgesaugt, gewaschen, in Salzsäure suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Schwefelwasserstoff durch Luft weggeblasen und das Filtrat vom Quecksilbersulfid zur Trockene eingedampft. Es resultiert ein krystalliner, brauner Rückstand. Dieser wird in Wasser aufgenommen, mit Tierkohle gekocht und zum Syrup eingeengt. Der noch warme Syrup wird mit Alkohol versetzt. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank werden die ausgefallenen Krystalle abgesaugt und nochmals mit Wasser und Alkohol umkrystallisiert. Sie erwiesen sich als reines Histidinchlorhydrat vom charakteristischen Schmelzpunkt 255°. Ein Mischschmelzpunkt mit Histidinchlorhydrat ergibt keine Depression. Die *Knoop*'sche Reaktion ist stark positiv. Die alkoholischen Mutterlaugen werden eingedampft, mit verdünntem Alkohol wieder aufgenommen und nochmals mit Tierkohle behandelt. Nach dem Einengen ergibt sich eine weitere Fraktion von reinem Histidinchlorhydrat. Die zweite Mutterlauge wird mit Pikrolonsäure gefällt. Das Pikrolonat gibt nach dem Umkrystallisieren den richtigen Schmelzpunkt von 231°. Aus diesem Pikrolonat gelingt es, nochmals eine kleine Menge Histidinchlorhydrat vom richtigen Schmelzpunkt zu isolieren. Es werden im ganzen ca. 4 g reines Histidinchlorhydrat isoliert. Es ist zu bemerken, dass in den Mutterlaugen noch ungefähr 100 bis

200 mg einer undeutlich krystallisierenden Substanz enthalten sind, welche intensive *Knoop*'sche Reaktion geben, sodass es sicher auch als Histidinchlorhydrat anzusprechen ist. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass sich mittels der Histidase-Reaktion 87% der erwarteten Ammoniakmenge nachweisen liessen.

4. Versuchsreihe

Zusatz von l-Histidinchlorhydrat zu Meerschweinchenharn

Dem Harn wurde eine bestimmte Menge l-Histidinchlorhydrat zugesetzt und dieser in der oben beschriebenen Weise untersucht.

Ansatz	Zuges. Harnmenge ccm	Zuges. l-Histidinchlorh.	gefunden. l-Histidinchlorhydrat				Zuges. enzym. bestim. NH_3	gefunden. Histidase-N			
			1. Reihe		2. Reihe			1. Reihe		2. Reihe	
		mg	mg	%	mg	%	mg	mg	%	mg	%
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	5	62,88	64,0	100	59,2	94	8,4	8,5	100	6,8	81
IV	5	41,92	41,6	100	40,0	96	5,6	5,0	90	4,8	86
V	5	20,96	21,6	100	19,2	92	2,8	2,5	90	2,3	83
VI	0	62,88	62,4	100	53,6	85	8,4	7,7	90	7,5	89
VII	0	41,92	41,6	100	38,4	84	5,6	5,1	90	4,4	79
VIII	0	20,96	20,8	100	17,6	84	2,8	2,5	89	2,4	86

Diskussion der Ergebnisse

Aus den mitgeteilten Untersuchungen geht zunächst hervor, dass parenteral verabreichtes l-Histidin von einer bestimmten Belastungsgrenze an im Harn wieder erscheint. Diese Belastungsgrenze ist weit höher als wie diejenige von unnatürlichem d-Histidin. In diesem Sinn werden die Untersuchungen von *Abderhalden* und *Hanson* (39) bestätigt. Bei dem genaueren Eingehen in das Problem aber ergibt sich ein eigentümlicher Unterschied zwischen photometrisch- und enzymatisch-bestimmbarem Histidin im Harn, indem immer nur ein Bruchteil des photometrisch bestimmbaren Histidins enzymatisch nachweisbaar ist. Dies eröffnet einen neuen Gesichtspunkt für zukünftige Untersuchungen. Es ist die Frage zu klären, ob die Differenz der beiden Untersuchungsmethoden auf die Gegenwart von Urocaninsäure oder auf die Anwesenheit einer anderen Verbindung des Histidins zurückzuführen ist*). Bei den Versuchen am Kaninchenharn liess sich Urocaninsäure nicht nachweisen, was wieder eine Bestätigung der *Abderhalden*'schen Befunde darstellt. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Behauptung *Kiyokawa*'s, dass im Kaninchenharn nach Histidinbelastung Urocaninsäure aufzufinden ist. Die Versuche zeigen deutlich die Bevorzugung der natürlichen Modifikation der verabreichten Aminosäure. Sie eröffnen in dem Sinn einen neuen Gesichtspunkt, dass durch weitere Untersuchungen ermittelt werden muss, wie es möglich ist, dass das unnatürliche d-Histidin zu einem Teil zurückgehalten wird. Die Verwertung der unnatürlichen d-Modifikation ist noch vollkommen undurchsichtig, denn in enzymatischen Versuchen mit Organschnitten, -extrakten ergibt sich z. B. gerade beim Meerschweinchen keine Abbaumöglichkeit des Histidins. Die Umwandlung der d-Form in die natürliche l-Form ist zunächst für das Histidin noch vollkommen ungeklärt.

Die Spezifität des Stoffwechsels wird durch die Versuche mit Imidazolmilchsäure neuerdings dargetan. Die Substitution der α-Aminogruppe durch die Hydroxylgruppe macht das Molekül für die Enzyme des Organismus vollkommen unangreifbar. In bezug auf das Schwangerschaftsproblem geht aus den mitgeteilten Versuchen hervor, dass es nicht angängig ist, die Ausschüttung von Prolan als *alleinige* Ursache der Histidinurie darzustellen, denn in diesem Falle hätte eine l-Histidinbelastung des graviden Meerschweinchens eine Senkung der Ausscheidungsschwelle zur Folge haben müssen.

*) Siehe Fussnote S. 11.

Dass es sich bei der menschlichen Histidinurie wirklich um Ausscheidung von Histidin handelt, haben erstmalig *Armstrong* und *Walker* (50) gezeigt, indem sie aus 10 Litern Gravidenharn 0,2 g reines Histidin darstellen konnten. Diese Versuche wurden in unveränderter Form in diesem Institut wiederholt, und es konnte tatsächlich aus Gravidenharn l-Histidin isoliert werden, denn es war möglich, die isolierte Aminosäure durch Leberhistidase abzubauen. Auch diese Verhältnisse müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden, insbesondere muss festgestellt werden, warum gerade bei der menschlichen Gravidität Histidinurie auftritt. Es sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, dass in der menschlichen Leber das urikolytische Ferment fehlt, welches in allen tierischen Lebern vorhanden ist. Es ist durchaus denkbar, dass eine Beziehung zwischen Histidinstoffwechsel und Harnsäureabbau besteht. *Abderhalden* hat ja in dieser Richtung gehende Versuche unternommen, die allerdings noch des Ausbaus bedürfen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es wird ein Methode beschrieben, mittels der das Histidin auf photometrischem Wege bestimmt werden kann.
2. Bei parenteraler Belastung männlicher und weiblicher Meerschweinchen mit l-Histidin ergibt sich, dass die Ausscheidungsschwelle des Histidins für beide Geschlechter gleich gross ist.
3. Es besteht kein Unterschied in der Ausscheidung des Histidins zwischen graviden und nichtgraviden Meerschweinchen.
4. Imidazolmilchsäure wird nach subcutaner Injektion von 0,1 g pro 100 g Körpergewicht quantitativ wieder ausgeschieden.
5. Bestimmt man im Meerschweinchenharn das Histidin auf photometrischem und auf enzymatischem Wege, so ergeben sich für die photometrischen Werte viel höhere Zahlen. Setzt man zu Meerschweinchenharn l-Histidin zu, so differieren die photometrischen und enzymatischen Werte nur um ca. 10%. Es besteht demnach ein Unterschied, der noch der Klärung bedarf.